

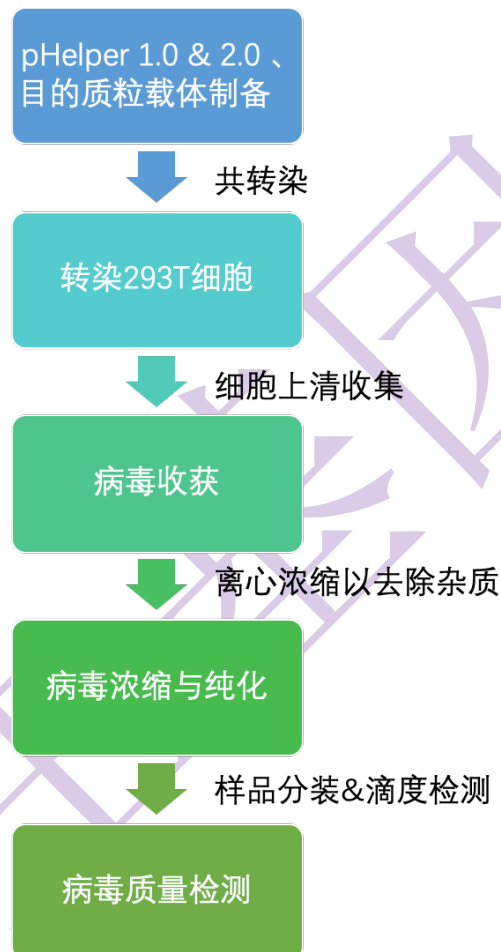
慢病毒包装和操作手册

第一部分 病毒包装	3
1. 包装流程	3
2. 包装步骤	3
HEK 293FT 细胞准备	3
2.2. 慢病毒包装系统转染	4
2.3. 慢病毒收集和浓缩	5
2.4. 病毒质量控制	5
2.4.1. 物理指标检测	5
2.4.2. 无菌检测	5
2.4.3. 病毒滴度测定	5
第二部分 病毒操作	7
1. 注意事项	7
1.1. 慢病毒的使用环境	7
1.2. 清洗与消毒	7
1.3. 储存	7
1.4. 运输	7
2. 慢病毒的稀释	7
3. 感染预实验	8
4. 慢病毒感染 MOI 预实验步骤(以 96 孔板为例)	8
4.1. 第一天:铺板	8

4.2. 第二天：感染。	8
5. 贴壁细胞的感染.....	9
5.1. 第一天：铺板	10
5.2. 第二天：病毒感染，换液	10
5.3. 第五天：观察荧光表达情况	10
6. 悬浮细胞的感染.....	11
6.1. 第一天: 感染.....	11
6.2. 第二天: 换液.....	11
6.3. 第五天：观察荧光表达情况	11
第三部分 常见问题.....	12
第四部分 常见细胞 MOI 列表	16

第一部分 病毒包装

1. 包装流程



2. 包装步骤

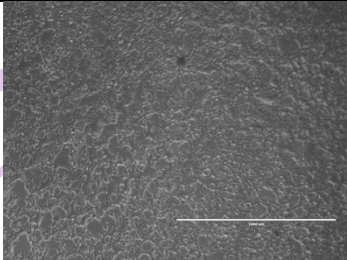
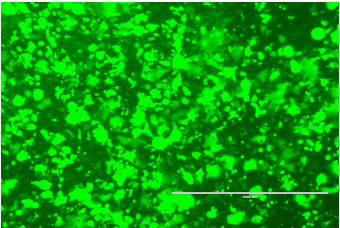
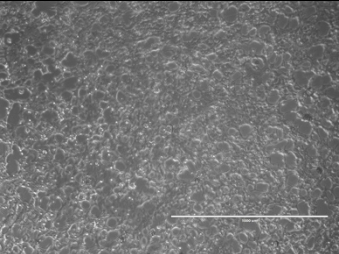
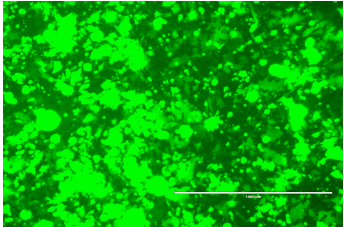
5.1. HEK 293FT 细胞准备

将 $3\sim5\times10^6$ 个 HEK 293FT 细胞传代接种至 100 mm 细胞培养皿中，置于 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中，培养 16 h~24 h。传代过程中需要将细胞充分消化为单细胞悬液，以获得较好的包装效果。

2.2. 慢病毒包装系统转染

- 1) 将慢病毒包装试剂盒中的包装质粒混合物 (Package Plasmid Mix) 及慢病毒表达质粒使用 ddH₂O 稀释为终浓度 1.0 µg/µL 的质粒溶液；
- 2) 取 1 支 1.5 mL 离心管 (标记为 A 管) , 分别加入 300 µL Opti-MEM 培养基及 40 µL EpFectTM Transfection Reagent , 混匀后室温静置 5 min ;
- 3) 取 1 支 1.5 mL 离心管 (标记为 B 管) , 加入 2.5 µL 终浓度为 1.0 µg/µL 的慢病毒表达质粒质粒溶液及 7.5 µL Package Plasmid Mix , 充分混匀；
- 4) 将 A 管中溶液加入 B 管中 , 充分混匀 , 室温静置 15~30 min ;
- 5) 将 B 管中的混合溶液逐滴均匀加入接种 HEK 293FT 细胞的培养皿中 , 轻微水平震荡培养皿以混匀 , 将培养皿置于 37 °C , 5% CO₂ 培养 6 h , 将培养基更换为 37 °C 水浴预热的新鲜完全培养基；

慢病毒包装过程中荧光表达情况示例

载体 编号	白光	绿色荧光
目的		
对照		

2.3. 慢病毒收集和浓缩

- 1) 转染 48 h 后，收集含有慢病毒的上清液，向培养皿中补充 10~15 mL 新鲜的完全培养基；继续培养 24 h，进行第二次病毒上清液收集；
- 2) 将两次收集的病毒上清液混合，0.45 μm 滤器过滤，过滤后的病毒液可以进行浓缩或直接感染目的细胞；
- 3) 按照病毒上清液：浓缩试剂 = 5:1 比例进行混合，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h 或过夜；
- 4) 将混合液按照 4 $^{\circ}\text{C}$ ，4000 g 离心 30 min，可见管底有米白色沉淀；
- 5) 小心移去上清，切勿碰触沉淀物，加入适量体积无血清培养基或 PBS 溶液，用微量移液器轻轻吹打重悬沉淀物；
- 6) 将病毒浓缩液分装，保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ ，即取即用，切忌反复冻融。

2.4. 病毒质量控制

慢病毒的质量控制要点包括物理状态检测、无菌检测及病毒滴度检测。

2.4.1. 物理指标检测

- 1) 颜色判定：通过肉眼判定，慢病毒保存液呈澄清液体状。
- 2) 粘稠度判定：用 20-200 μL 规格移液器缓慢吸取 50 μL 慢病毒保存液体，无明显粘稠感或吸液滞后现象；

2.4.2. 无菌检测

将病毒加入 293T 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无明显颗粒存在，培养基澄清透明。

2.4.3. 病毒滴度测定

合生基因采用的慢病毒滴定方法是 qPCR 法，具体流程为：

- 1) 细胞接种 :将生长状态良好的 HEK 293H 细胞消化计数后 ,按照 10^5 细胞/孔接种至 12 孔培养板中 ,每种病毒接种 3 个孔 ,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养 16~24 h ;
- 2) 病毒感染 取 20 μL 浓缩后的慢病毒液 稀释 10 倍后 ,分别取 100/50/25 μL ,加入接种有 HEK 293H 细胞的 12 孔板中 ,并添加终浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 的促感染试剂 Polybrene 将培养液混匀后 ,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养 48~72 h ;
- 3) 滴度测定 :提取上述感染慢病毒的 HEK 293H 细胞的基因组 DNA ,稀释已知拷贝数的 DNA 标准品 ($10^4\sim 10^9$ copies/ μL) ,与上述基因组同时进行 qRT- PCR 检测 ,qRT-PCR 实验的扩增/检测对象为慢病毒载体上的 WPRE 序列(WPRE 序列可以随目的基因整合入细胞基因组) ,根据 qRT-PCR 的实验数据进行整理换算 ,即可获得慢病毒液的滴度。

第二部分 病毒操作

1. 注意事项

1.1. 慢病毒的使用环境

请在生物安全柜中操作和使用慢病毒。

1.2. 清洗与消毒

任何接触过病毒的材料、试剂、样品,应经消毒处理,可以采用 1%的 SDS 溶液或 84 消毒液(1:20)浸泡半小时以上,或 121°C,灭菌 20~30 分钟。

实验完成后,请用医用洗手液清洗双手。切勿直接接触病毒,如意外接触,请及时用清水冲洗,并适当对皮肤进行消毒。

1.3. 储存

慢病毒应于-80°C条件下长期保存,临时使用可以置于 4°C(一周内使用,且存放时间越长,滴度下降越明显)。建议不要在-20°C下长期保存慢病毒,避免反复冻融。通常情况下病毒可于-80°C条件下稳定保存约 6 个月,超过此期限后请重新检测病毒滴度。

1.4. 运输

运输过程中应避免发生反复冻融的情况,一般采用泡沫箱加干冰后包装运输,并根据运输时间和环境调整干冰使用量,以保证在病毒运送到目的地之前,大部分干冰仍处于固体状态。

2. 慢病毒的稀释

从-80°C条件下取出慢病毒后,4°C冰箱中暂存。如果需要稀释病毒,可加用 PBS 或培养基,适当稀释后使用。

注:详细的稀释方法可以参考本文件常见问题解答 09)。

3. 感染预实验

每种细胞对慢病毒的敏感性不同，有的容易感染，有的则比较难，同时每种慢病毒载体荧光强度也有差异，所以在正式实验前需要做病毒感染预实验来确认 MOI 值以达到理想的实验效果。理论上 MOI 值越高，慢病毒感染上的可能性越大，感染效率越高，但是这样对细胞的毒性也就越大。所以预实验确认 MOI 值是要在细胞成活率和感染效率中找到一个平衡点。

一般如果 MOI 超过 100，甚至 200 还感染不上，说明慢病毒非常难感染这株细胞，甚至感染不上，那么就要考虑换一种方式，比如腺病毒或者电转。

4. 慢病毒感染 MOI 预实验步骤(以 96 孔板为例)

4.1. 第一天:铺板

在 96 孔板中按每孔约 1×10^4 个细胞接种。

注：如果细胞特别大可以适当减少，特别小可以增加，原则上以第二天，汇合度达到 30%~40%为宜。

4.2. 第二天：感染。

4.2.1. 设计 MOI 梯度实验组

- 1) MOI 依次设置为: 0、1、10、20、50、100。
- 2) 同时设置加含 8 ug/ml Polybrene 的培养基实验组。
- 3) Blank 组即空细胞组，作为参照，以检验细胞生长状态。

Polybrene (8μg/ml)	MOI 0	MOI 1	MOI 10	MOI 20	MOI 50	MOI 100
----------------------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	------------

Polybrene(0μg/ml)	MOI 0	MOI 1	MOI 10	MOI 20	MOI 50	MOI 100
Blank						

细胞感染预实验分组设计

注: Polybrene 的使用请参见本文件常见问题 08) , 本感染预实验中

Polybrene 的浓度默认设置为 8ug/ml。

4.2.2. 计算病毒量

每孔加病毒量(ul)=MOI x 感染时的细胞数/滴度(TU/ml)×1000

注：一般第二天细胞数按倍增来算，生长较慢或不增殖的细胞可适当调整。

例如：病毒滴度 1×10^8 TU/ml，接种细胞数 1×10^4 ，那么 MOI 为 10 的组

中病毒量 = $10 \times 2 \times 1 \times 10^4 / (1 \times 10^8) \times 1000 = 2 \text{ul}$ ，依次类推。

4.2.3. 加慢病毒

按照计算好的量将病毒液分别加入培养基中，混匀，继续培养。

注：如果遇到病毒滴度太高，每孔加的病毒太少，移液器量程不够等情况，可以先将病毒稀释后再加。有关稀释的方法请参考本文件常见问题 09) 。

4.3. 第三天：换液

感染后 12-24 小时，将各实验组更换为新鲜培养基，继续培养。

4.4. 第五天：确定合适的 MOI 值

- 1) 感染后 72 小时在荧光显微镜下观察，并拍照。
- 2) 确定合适的 MOI 值。

5. 贴壁细胞的感染

以 24 孔板为例:

5.1. 第一天：铺板

准备细胞将状态良好的目的细胞接种到 24 孔板中 细胞计数后 进行铺板，
每孔加入 500ul 培养基。保证第二天感染病毒时融合率达到 30-40%。通常，
24 孔板内以 $5 \sim 10 \times 10^4$ cells/孔的密度铺板。

5.2. 第二天：病毒感染，换液

1) 计算病毒加样量

根据预实验的结论，选择合适 MOI 值和感染条件，进行病毒感染，加
样量计算方法： $(\text{细胞数} \times \text{MOI 值} / \text{病毒原液滴度}) \times 10^3 = \text{病毒加样量}(\text{ul})$

注：由于细胞状态之间的差异，建议每次在选定 MOI 后，再分别设置高低
MOI 实验组，减少因细胞状态差异导致的感染效果差异。

2) 感染

按照预实验的结论更换为相应的培养基，然后加入对应量的病毒。(假
设预实验的结论是在含 8ug/ml Polybrene 的 DMEM 培养基的条件下感染
效果较好，则更换为含 8ug/ml Polybrene 的 DMEM 培养基，再加入病毒)

3) 换液

病毒感染 12-24 小时后，观察细胞状态。如细胞状态差，尽快换新鲜
培养基；如细胞状态良好，可以在 24 小时内换液，但不宜超过 24 小时。

5.3. 第五天：观察荧光表达情况

病毒感染细胞 72 小时后，在荧光显微镜下观察细胞，判断慢病毒感染
目的细胞的效率。若荧光弱，可到 96 小时后观察。

6. 悬浮细胞的感染

6.1. 第一天: 感染

悬浮或半悬浮细胞可以通过离心的方法来辅助感染,即将病毒液加入细胞后,用 Parafilm 膜密封,低速离心 1 小时,然后放回培养箱继续培养。

如没有水平转子,可采用离心管代替,将细胞吹打转入离心管中,进行低速离心,去掉大部分上清液,重新悬浮细胞,加入病毒液,培养箱中放置 1 小时后转入培养皿中继续培养。

6.2. 第二天: 换液

感染后 12~24 小时更换培养基。

6.3. 第五天: 观察荧光表达情况

病毒感染细胞 72 小时后,在荧光显微镜下观察细胞,判断慢病毒感染目的细胞的效率,若荧光弱,可到 96 小时后观察。

第三部分 常见问题

1. 你们提供的慢病毒具有复制能力吗?会传染人吗?

合生基因提供的慢病毒颗粒是一种假病毒，病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代，具有感染能力但是不具有复制能力,因此是不会传染人的，是相对很安全的一种工具，但该病毒仍然具有潜在的生物学危险，不建议使用编码已知或可能会致病的基因的假型病毒。除非已经完全公认某个基因没有致病性，否则均不建议采用假型病毒。进行相关的慢病毒实验时建议使用生物安全柜。

2. 某细胞株的 MOI 值是多少?

您可以查阅文献，也可以按照本手册感染预实验中的 MOI 测定方法对其进行测定。由于不同实验室细胞状态等存在差异可能导致细胞 MOI 值有差异,建议实验前都先用对照病毒进行 MOI 预实验摸索合适的 MOI。

3. 什么是 MOI?

MOI, 复感染指数,是指病毒对细胞的感染能力, MOI 越高, 细胞越难被感染。

通常把某株细胞有 80%被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的 MOI。

4. 如何确定向细胞中加入慢病毒的最佳时间?

慢病毒感染细胞后需要 72~96h 才能观察到慢病毒携带的基因表达, 应在细胞汇合度 30~40%时且细胞状态良好时加入慢病毒, 确保在感染后 72~96h 细胞增长达到 90%~100%的汇合度。

5. 为什么我的病毒感染细胞后荧光不亮?

由于目的基因和荧光蛋白表达的方式不一样, 导致荧光表达有差异的情况也时有发生。

1) 目的基因和荧光蛋白融合表达, 少数的目的基因对融合的荧光蛋白的荧光有影响(可能是目的基因表达量低, 导致融合蛋白的表达量也低, 荧光不亮; 也可能是目的基因对荧光蛋白的结构和功能有影响, 导致荧光不亮), 建议使用 sfGFP 代替常用的 EGFP 看是否有改善。

2) 目的基因和荧光蛋白使用不同的启动子表达, 那么荧光强度更多的与启动子在目的细胞中的表达强弱有关。

3) 使用目的基因-IRES-荧光蛋白这种结构,由于 IRES 下游基因表达偏弱, 容易导致荧光弱。

4) 使用目的基因-2A-荧光蛋白这种结构, 2A 上游的目的基因和下游的荧光蛋白在蛋白翻译的时候断开, 如果上游的目的基因表达量低(譬如有很多稀有密码子), 也会导致下游的荧光蛋白表达受影响, 导致荧光弱。

6. 慢病毒感染是不是一定要用安全柜,没有怎么办?

病毒操作时应使用生物安全柜,如果没有生物安全柜,操作病毒时请关闭排风机。

7. 慢病毒感染细胞后什么时候基因表达达到峰值?

慢病毒表达时间较慢, 表达所需时间较长, 大部分细胞在慢病毒感染后 72~96 小时, 荧光或目的基因表达达到峰值, 但是对于生长缓慢的细胞, 时间可能会更长。

8. Polybrene 如何使用?

Polybrene 是一种阳离子聚合物, 可以中和电荷以促进假病毒外壳与细胞膜之间结合。Polybrene 最佳浓度因不同细胞株而异, 通常范围为 2~10ug/ml, 可以通过预实验来摸索或查阅相关文献。Polybrene 长时间的作用(大于 12 小时)可能对某些细胞产生毒性作用, 影响细胞状态, 某些原代细胞如神经元等, 不适合使用 Polybrene。

9. 慢病毒如何进行梯度稀释?

慢病毒可以用培养基、D-Hanks 液、PBS 液进行稀释, 稀释过的病毒建议尽快使用完。一般病毒可以直接加入正在培养的细胞中, 轻晃混匀孵育, 不用提前配置含病毒的培养基。

梯度稀释示例: 假设病毒滴度为 1×10^9 TU/ml, 则取 10ul 病毒液加入到 90ul 培养基中, 则稀释后的病毒液滴度为 1×10^8 TU/ml, 依次类推。

10. Puromycin 怎么用, 浓度多少?

嘌呤霉素(Puromycin)是由白黑链霉菌(*Streptomyces alboniger*)发酵代谢产生的一种氨基糖苷类抗生素, 通过抑制蛋白质合成而杀死革兰氏阳性菌、各种动物和昆虫细胞。每种细胞对抗生素的敏感性不同, 所以 Puromycin 最佳浓度因不同细胞而异, 通常范围 1~10ug/ml, 具体可以通过做嘌呤霉素杀灭曲线或者查阅文献来摸索。

以下以 24 孔板为例:

1) 第一天:在 24 孔板内以 $5 \sim 10 \times 10^4$ cell 孔的密度铺板,铺足够量的孔以进行后续的梯度实验,细胞 5%CO 培养箱育过夜;

2) 第二天:准备筛选培养基

配制含不同浓度嘌呤素的新鲜培养基(如 0-15mg/ml, 至少 5 个梯度), 更换为含嘌呤霉素的培养液, 继续培养。约 2~3 天后, 继续更换含嘌呤霉素的培养基, 维持细胞的继续生长;

3) 每日观察细胞,监测存活细胞比例;

4) 最低耐受浓度就是指从抗生素筛选开始 1~4 天内杀死所有细胞的最低浓度。

11. 慢病毒通常可以装多大的基因?

通常情况下, 包含标记基因在内, 不超过 4kb, 且一般情况下, 载体越大, 可能导致病毒包装滴度越低。

12. 慢病毒载体不包病毒能不能当质粒用?

可以, 但不适合于制备稳转细胞株, 且装载基因后载体较大(10Kb 以上)。

13. 慢病毒能不能用于体内？

由于慢病毒的免疫原性，毒性、滴度等原因，尤其整体注射实验易被免疫系统清除，体内实验推荐使用我们的腺相关病毒。

14. 慢病毒和逆转录病毒使用上的区别？

慢病毒可以感染分裂与非分裂细胞，逆转录病毒只能感染分裂的细胞。逆转录病毒常在发育与损伤修复相关研究中使用。



第四部分 常见细胞 MOI 列表

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene
K562	人白血病细胞	20 ~ 40	可
Jurkat	人白血病细胞株	50 ~ 80	不可
kasumi	人白血病细胞株	10 ~ 30	不可
NB4	人白血病细胞株	50 ~ 80	不可
U937	人单核细胞	20 ~ 40	可
THP-1	人单核细胞株	50 ~ 80	可
GBC-SD	人胆囊癌细胞株	30 ~ 50	不可
H929	人多发性骨髓瘤 细胞系	100 ~ 150	不可
H1299	人非小细胞性癌 细胞	1 ~ 3	可
95D	人肺巨细胞癌	2 ~ 4	可
A549	人肺腺癌	20 ~ 40	可
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	100 ~ 150	可
7402	人肝癌细胞	10 ~ 15	可
Hep 3B	人肝癌细胞	10 ~ 30	可
Hep G2	人肝癌细胞	10 ~ 30	可
SMMC-7721	人肝癌细胞	10 ~ 30	可

Huh-7	人肝癌细胞系	10 ~ 30	可
Hela	人宫颈癌细胞株	10 ~ 30	可
HOS	人骨肉瘤细胞系	20 ~ 40	可
Hep-2	人喉癌细胞株	10 ~ 30	可
HL-60	人急性髓系白血病 细胞株	>100	可
HT-29	人结肠癌细胞	10 ~ 30	可
PKO	人结肠癌细胞	2 ~ 4	可
SW480	人结肠癌细胞株	10 ~ 30	可
DLD-1	人结直肠肿瘤胞 株	10 ~ 30	可
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	2 ~ 4	可
SHG-44	人脑胶质瘤细胞	10 ~ 30	可
U251	人脑胶质母细胞瘤	1 ~ 3	可
U87	人脑星型胶质母细 胞瘤	1 ~ 3	可
293T	人胚肾上皮细胞	1 ~ 3	可
HUVEC-2C	人脐静脉血管内皮 细胞	10 ~ 30	可
PC-3	人前列腺癌细胞	20 ~ 40	可
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10 ~ 30	可
MCF-7	人乳腺癌细胞株	20 ~ 40	不可

Tca8113	人舌鳞状细胞癌	10 ~ 30	可
RPE	人视网膜色素上皮细胞	10 ~ 30	可
AGS	人胃癌细胞	100 ~ 150	可
BGC-823	人胃癌细胞	100 ~ 150	可
SGC-7901	人胃癌细胞	10 ~ 30	可
MKN-28	人胃癌细胞株	20 ~ 40	可
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20 ~ 40	可
BxPc-3	人胰腺癌细胞	20 ~ 40	可
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	50 ~ 80	可
Panc-1	人胰腺癌细胞	2 ~ 4	可
HEC-1-B	人子宫内膜癌细胞株	2 ~ 4	可
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20 ~ 40	可
Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10 ~ 30 (感染分化)	不可
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	20 ~ 40	可
HSC-T6	大鼠肝星型细胞	10 ~ 30	不可
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	>100	可
NRK	大鼠肾细胞	10 ~ 30	可

注：不同实验室由于细胞的来源、代数和细胞状态等因素的影响，MOI 值也略有差异，以下数据是在细胞感染效率在 85-100%细胞状态良好的情况下获得的，仅供参考。

